

## 研究报告

## 土霉素菌渣源酵母菌的筛选及其培养条件的优化

倪巍洪<sup>1</sup>, 钱斯日古楞<sup>1</sup>, 周传文<sup>2</sup>, 王红英<sup>\*1</sup>

1 大连工业大学生物工程学院, 辽宁 大连 116034

2 中肽生物科技(大连)有限公司, 辽宁 大连 116034

倪巍洪, 钱斯日古楞, 周传文, 王红英. 土霉素菌渣源酵母菌的筛选及其培养条件的优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3037-3048

Ni Weihong, Qian Siriguleng, Zhou Chuanwen, Wang Hongying. Screening of yeast from oxytetracycline fermentation residue and optimization of the fermentation conditions[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3037-3048

**摘 要:**【背景】随着制药行业的蓬勃发展, 中国每年产生大量的抗生素菌渣, 已造成了不可忽视的环境污染和资源浪费等问题。由于抗生素菌渣中含有丰富的蛋白质等有机物质, 利用其蛋白质等进行二次生产或将成为解决抗生素菌渣处理问题的一种有效方法。【目的】从土霉素菌渣中筛选出天然酵母菌菌株, 并利用土霉素菌渣作为酵母菌生长的主要培养基成分, 通过其培养条件的优化, 实现土霉素菌渣的资源化利用。【方法】以土霉素菌渣为样品, 运用稀释涂布法进行酵母菌的筛选, 通过其形态学观察和 18S rRNA 基因序列分析等方法对菌株进行鉴定。通过单因素试验与 Box-Behnken Design 试验结合, 对培养条件进行优化, 确定筛选菌株在以土霉素菌渣为主要成分培养基中的最佳生长条件。【结果】筛选的土霉素菌渣源酵母菌为一株希腊接合囊酵母菌(*Zygoascus hellenicus*) Y1, 其最佳培养条件为: 土霉素菌渣添加量为 5%, 葡萄糖添加量为 0.5%, 接菌量为 2%, 在 pH 5.0、32 °C、160 r/min 条件下培养 24 h。【结论】筛选到一株希腊接合囊酵母菌 Y1, 该菌能够很好地利用土霉素菌渣进行生长, 实现了土霉素菌渣的资源化利用, 大大减少了菌渣的排放, 也为后续制备菌渣酵母膏奠定了基础。

**关键词:** 土霉素菌渣; 酵母菌; 菌种鉴定; 培养条件优化

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项(222089)

Supported by: Major Special Project of Science and Technology of Inner Mongolia Autonomous Region (222089)

\*Corresponding author: E-mail: 2002wanghongying@163.com

Received: 2021-12-19; Accepted: 2022-02-21; Published online: 2022-03-22

## Screening of yeast from oxytetracycline fermentation residue and optimization of the fermentation conditions

NI Weihong<sup>1</sup>, QIAN Siriguleng<sup>1</sup>, ZHOU Chuanwen<sup>2</sup>, WANG Hongying<sup>\*1</sup>

1 School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China

2 Dalian CHNTAI Limited Company, Dalian 116034, Liaoning, China

**Abstract:** [Background] With the development of pharmaceutical industry, an enormous amount of antibiotic fermentation residue is produced every year in China, which has caused environmental pollution and waste of resources. However, the residue is rich in proteins and other nutrients which can be used for secondary production, making it possible for effective utilization of the residue. [Objective] To screen yeast from oxytetracycline fermentation residue and optimize the culture conditions of the yeast in the medium with the residue as the main component for resource utilization of oxytetracycline fermentation residue. [Methods] Yeast strain was screened from oxytetracycline fermentation residue with the serial dilution-agar plating method. The strain was then identified through morphological observation and 18S rRNA sequence analysis. Single-factor experiment and Box-Behnken design were used to optimize the culture conditions and determine the optimal growth conditions of the strain in the medium with oxytetracycline fermentation residue as the main component. [Results] The *Zygoascus hellenicus* Y1 strain was screened out. The optimum culture conditions are as follows: oxytetracycline fermentation residue at 5%, glucose at 0.5%, inoculum at 2%, pH 5.0, 32 °C, 160 r/min, 24 h. [Conclusion] Y1, which can make full use of the oxytetracycline fermentation residue for growth, was screened out, realizing the resource utilization of the residue and reducing the discharge of bacterial residue. The result lays a foundation for the preparation of yeast extract with oxytetracycline fermentation residue.

**Keywords:** oxytetracycline fermentation residue; yeast; identification of strain; optimization of fermentation conditions

我国是世界上最大的抗生素生产和消费国,产量约为每年 21.8 万 t。在抗生素生产中,工厂会产生大量以菌种菌丝体和发酵培养基残留为主的菌渣<sup>[1-2]</sup>。抗生素生产企业主要采用焚烧、填埋、饲料化或厌氧消化等方法对土霉素菌渣进行处理<sup>[3-5]</sup>。近年来,国家加强了对污染物排放的要求,使得菌渣的处理成为制约企业生产的一大因素<sup>[6]</sup>。由于抗生素菌渣中含有丰富的蛋白质和多糖等可利用成分<sup>[7]</sup>,对菌渣的资源化利用成为学者们的研究热点。如:惠兴育<sup>[8]</sup>将四环素菌渣中的丰富蛋白质成分作为培

养基的氮源成分,进行微生物的培养;王冰<sup>[9]</sup>将青霉素菌渣中的蛋白质分离纯化,制成蛋白质制品。我们研究的土霉素菌渣样品中,蛋白含量可达到干重的 50%左右,多糖含量为 10%左右,灰分为 14%左右,如果将土霉素菌渣中的丰富营养成分加以利用,不仅可达到废物利用的目的,还可减少环境污染<sup>[10]</sup>。本文从土霉素菌渣中进行天然酵母菌的筛选,通过形态学观察和 18S rRNA 基因序列分析等方法对其进行鉴定;对筛选菌株以土霉素菌渣为主要培养基成分的培养条件进行优化,实现菌渣的

资源化利用, 以期为后续制备菌渣酵母膏提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

土霉素菌渣是由内蒙古华曙生物科技有限公司提供的鲜菌渣。

#### 1.1.2 培养基

YPD 培养基、YPD 固体培养基成分与王冰<sup>[9]</sup>报道一致, 试剂均为国产分析纯, 北京奥博星生物技术有限责任公司。

5%菌渣培养基主要成分为粉碎后的菌渣(干重) 50.0 g/L, pH 5.5, 101 kPa 灭菌 20min。

#### 1.1.3 主要仪器

热场发射扫描电镜系统, 日本电子株式会社; 恒温培养振荡器, 上海制成分析仪器制造有限公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 25×16 型血球计数板, 上海市求精生化试剂仪器有限公司。

### 1.2 菌株的筛选

称取 1.0 g 鲜菌渣为样品, 加入含有 10 mL YPD 培养基的 250 mL 三角瓶中, 混匀, 在 30 °C、160 r/min 条件下富集培养 24 h; 吸取上清液, 用无菌水稀释至  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  倍; 将稀释液分别涂布于 YPD 固体培养基上, 30 °C 静置培养 24 h。选取单菌落进行进一步分离、纯化, 将纯化好的菌种在 4 °C 条件下用 YPD 固体培养基斜面保存。

### 1.3 形态学观察、生理生化实验及生长曲线的绘制

#### 1.3.1 形态学观察

菌落形态观察: 挑取在 YPD 固体培养基上培养 24 h 的菌落, 进行菌落形态观察。

菌株形态观察: 对培养好的菌株进行预处理, 利用扫描电子显微镜进行观察<sup>[11-13]</sup>。

#### 1.3.2 生理生化实验

菌株生理生化实验: 对菌株进行糖发酵、碳源同化试验、氮源同化试验<sup>[14-15]</sup>。

#### 1.3.3 生长曲线的绘制

用接种环挑取一环活化的菌株 Y1 接种到 100 mL YPD 培养基中, 在 30 °C、160 r/min 条件下培养, 每隔 3 h 用血球计数板进行菌株细胞的计数, 绘制生长曲线<sup>[16]</sup>。

菌株细胞数(个/mL)=

$$\frac{80 \text{ 个小方格菌株细胞总数}}{80} \times 400 \times 10^4 \times \text{稀释倍数}$$

### 1.4 系统发育树的构建

菌株纯化后送北京华大基因科技有限公司进行 18S rRNA 基因测序, 将得到的基因序列在 NCBI 上进行 BLAST 分析, 将结果导入 MEGA 7.0 并采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

### 1.5 发酵培养基与培养条件的优化

#### 1.5.1 种子液的配制

用接种环挑取一环活化的菌种接入 100 mL YPD 培养基中, 在 30 °C、160 r/min 条件下培养 24 h, 用生理盐水配制浓度为  $10^8$  个/mL 的菌悬液, 备用。

#### 1.5.2 葡萄糖添加量对菌株生长的影响

分别选取 0%、0.5%、1.0%、1.5% 和 2.0% 的葡萄糖添加量, 以 5% 菌渣培养基为基础, 在转速 160 r/min、初始 pH 5.5、接菌量为 1% 条件下培养 24 h, 用血球计数板计算发酵液中的菌数。

#### 1.5.3 菌渣添加量对菌株生长的影响

分别选取 0%、2.5%、5.0%、7.5% 和 10.0% 的菌渣添加量的培养基, 葡萄糖的添加量为 0.5%, 接菌量为 1%, 在初始 pH 5.5、培养温度 30 °C、转速 160 r/min 条件下培养 24 h, 用血球计数板计算发酵液中的菌数。

### 1.5.4 培养温度对菌株生长的影响

分别选取 25.0、27.5、30.0、32.5 和 35.0 °C 的培养温度,以 5%菌渣培养基为基础,葡萄糖添加量为 0.5%,接菌量为 1%,在初始 pH 5.5、转速 160 r/min 条件下培养 24 h,用血球计数板计算发酵液中的菌数。

### 1.5.5 发酵初始 pH 对菌株生长的影响

分别选取 pH 4.5、5.0、5.5、6.0 和 6.5 为发酵初始 pH,以 5%菌渣培养基为基础,葡萄糖添加量为 0.5%,接菌量为 1%,在培养温度 30 °C、转速 160 r/min 条件下培养 24 h,用血球计数板计算发酵液中的菌数。

### 1.5.6 培养转速对菌株生长的影响

分别选取 80、120、160、200 和 240 r/min 的摇床转速,以 5%菌渣培养基为基础,葡萄糖添加量为 0.5%,接菌量为 1%,在初始 pH 5.5、培养温度 30 °C 条件下培养 24 h,用血球计数板计算发酵液中的菌数。

### 1.5.7 接菌量对菌株生长的影响

分别选取 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%和 2.5%的接菌量,以 5%菌渣培养基为基础,葡萄糖添加量为 0.5%,在初始 pH 5.5、培养温度 30 °C、转速 160 r/min 条件下培养 24 h,用血球计数板计算发酵液中的菌数。

## 1.6 Box-Behnken Design 响应面设计

参考单因素试验与 Plackett-Burman 试验结果,选择 3 个影响显著的因素:发酵初始 pH、培养温度、培养转速,菌株菌数为响应值,利用 Design Expert 10 软件设计三因素三水平进行响应面优化试验<sup>[17-20]</sup>。试验因素水平设计见表 1。

表 1 因素水平设计表

Table 1 Factor level design table

Level	A: Temperature (°C)	B: pH	C: Rotation speed (r/min)
-1	25	4.5	120
0	30	5.0	160
1	35	5.5	200

## 1.7 菌渣主要成分在发酵过程中的变化

### 1.7.1 菌渣总量

精确称取 5.0 g 干重的粉碎后菌渣两份,分别配制 100 mL 培养基(含有 0.5%的葡萄糖);一份接酵母菌 Y1 (接菌量为 2%),另一份未接菌;分别在 pH 5.0、32 °C、160 r/min 条件下培养 24 h 后,5 000 r/min 离心 15 min,沉淀用去离子水冲洗 3 次后烘干,获得发酵后与未发酵的菌渣,精确称重。

### 1.7.2 含氮量与蛋白质含量

对用作氮源成分添加的土霉素菌渣的含氮量与蛋白质含量在发酵前后的变化进行比较。含氮量测定采用凯式定氮法,以 6.25 为蛋白系数计算蛋白质含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株筛选与鉴定

#### 2.1.1 菌株形态学观察

以土霉素菌渣为样品,通过稀释涂布法筛选得到酵母菌 Y1,在 YPD 固体培养基上生长的菌落形态和菌株形态见图 1 和图 2。

由图 1 可知,酵母菌 Y1 在 YPD 固体培养基上的菌落,呈白色、圆形凸起,表面光滑、



图 1 酵母菌 Y1 在 YPD 培养基上的菌落形态

Figure 1 Colony morphology of yeast Y1 on YPD medium.



图2 酵母菌 Y1 的扫描电镜图

Figure 2 Scanning electron microscope (SEM) diagram of yeast Y1.

湿润。由图 2 可知, 菌株形态呈卵圆状, 其大小约为  $4.0\ \mu\text{m} \times 2.0\ \mu\text{m}$ 。

### 2.1.2 菌株生理生化实验

对酵母菌 Y1 进行了糖发酵、碳源同化、氮源同化试验, 结果见表 2。

由表 2 可知, 该菌株可发酵葡萄糖、蔗糖、麦芽糖, 不可发酵淀粉; 可在以葡萄糖、壳聚糖、L-阿拉伯糖、乙醇为碳源的培养基中生长; 不可同化糊精与柠檬酸; 可在以硝酸钾、硫酸铵为氮源的培养基中生长。

表 2 酵母菌 Y1 的糖发酵、碳源利用、氮源同化试验

Table 2 Sugar fermentation, carbon source utilization and nitrogen source assimilation of yeast Y1

Physiological and biochemical tests		Yeast Y1
Sugar fermentation	Glucose	+
	Sucrose	+
	Maltose	+
	Starch	-
Carbon source utilization	Glucose	+
	Chitosan	+
	L-arabinose	+
	Ethanol	+
	Dextrin	-
	Citric acid	-
Nitrogen source assimilation	KNO <sub>3</sub>	+
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+

Note: +: Positive; -: Negative.

### 2.1.3 菌株生长曲线

在 30 °C、160 r/min 条件下, 酵母菌 Y1 在 YPD 培养基中的生长曲线见图 3。

由图 3 可知, 菌株 Y1 在生长初期的 0-9 h 内生长缓慢, 为菌株的生长延迟期; 9 h 之后, 菌体数量开始快速增加, 菌株进入快速生长期; 18 h 之后, 菌体生长量增长不明显, 为该菌的生长稳定期。

### 2.1.4 系统发育树

酵母菌 Y1 的系统发育树见图 4。图 4 结果表明菌株 Y1 与希腊接合囊酵母(*Zygoascus hellenicus*)的 18S rRNA 基因序列相似性达到 99%, 两者在系统发育树上处于同一分支, 因此可初步鉴定为希腊接合囊酵母菌属, 拟命名为希腊接合囊酵母菌(*Zygoascus hellenicus*) Y1。

## 2.2 菌株发酵条件的优化结果

### 2.2.1 葡萄糖添加量对菌株生长的影响结果

在 5% 菌渣培养基中, 葡萄糖添加量对菌株生长影响的结果见图 5。葡萄糖是微生物最容易利用的碳源, 因此以葡萄糖为菌株 Y1 培养的碳源。从图 5 可以看出, 在葡萄糖添加量低于 0.5% 时, 随着添加量的增加, 菌株数快

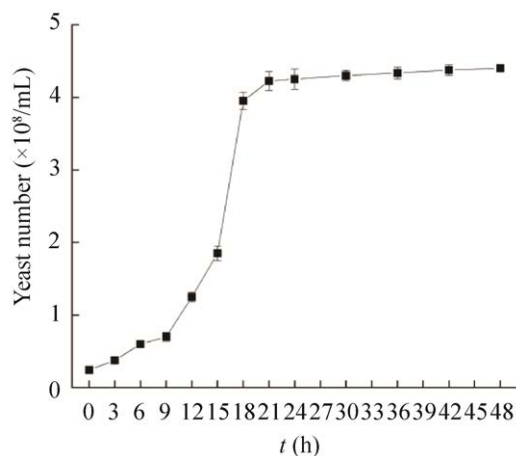


图3 酵母菌 Y1 的生长曲线

Figure 3 Growth curve of yeast Y1.

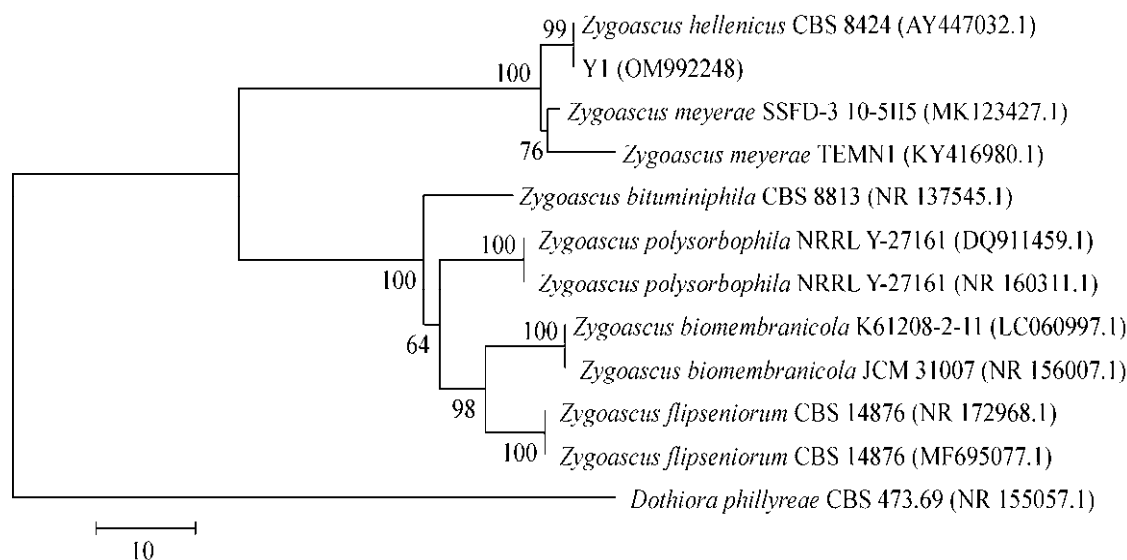


图 4 酵母菌 Y1 的系统发育树 括号内序列号为该菌株在 GenBank 上的注册号；分支点数字为自展值；比例尺：遗传距离

Figure 4 Phylogenetic tree of yeast Y1. Serial number in parentheses: The registration number of the strain on GenBank; Branch point numbers: Bootstrap value; Scale: Genetic distance.

速增加；添加量为 0.5% 时，菌数达到最高值  $3.65 \times 10^8$  个/mL；添加量超过 0.5% 时菌株数减少，这可能是因为葡萄糖浓度过高，碳氮比例不合适造成酵母生长缓慢。因此，选择 0.5% 的葡萄糖添加量为最佳添加量。

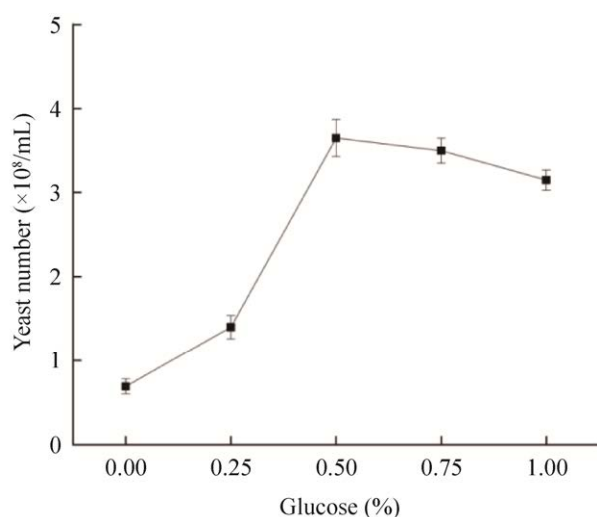


图 5 葡萄糖添加量对菌株生长的影响

Figure 5 Effect of glucose addition on strain growth.

## 2.2.2 菌渣添加量对菌株生长的影响结果

不同浓度的土霉素菌渣培养基对菌株生长影响的结果见图 6。由图 6 可以看出，菌渣添加量低于 5% 时，酵母菌 Y1 的数量随菌渣添加量的增长而增加；在 5% 的菌渣添加量时菌数

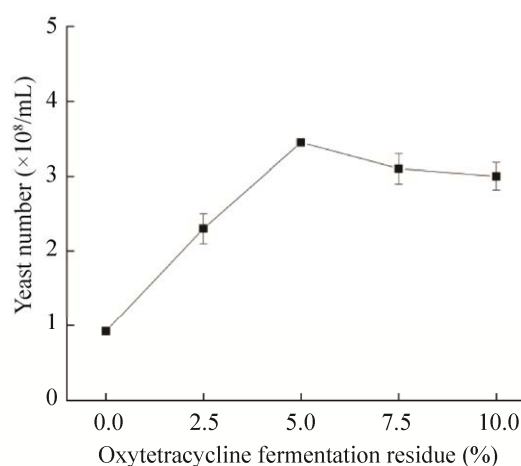


图 6 菌渣添加量对菌株生长的影响

Figure 6 Effect of the amount of oxytetracycline fermentation residue on strain growth.



达到最高值  $3.45 \times 10^8$  个/mL; 添加量超过 5% 时菌株数减少, 这可能是因为随着菌渣添加量的加大, 培养基固液比变大, 密度加大, 溶氧量变低, 再加上可利用的糖可能不足, 造成菌株的生长量减少。因此选择 5% 的土霉素菌渣为最佳菌渣添加量。

### 2.2.3 培养温度对菌株生长的影响结果

不同培养温度对菌株生长的影响见图 7。

环境温度对微生物生长影响较大, 在其最适温度下, 微生物生长速率最快, 细胞分裂周期变短; 同时也会影响其酶活性、细胞膜流动性、胞外物质溶解度等方面。由图 7 可以看出, 随着培养温度的提升, 菌株数量快速增长,  $30^\circ\text{C}$  时其数量达到最高值  $3.3 \times 10^8$  个/mL, 随后菌株数量缓慢下降, 因此选择  $30^\circ\text{C}$  作为菌株的最佳培养温度。

### 2.2.4 发酵初始 pH 对菌株生长的影响结果

不同发酵初始 pH 对菌株生长的影响见图 8。

pH 对微生物的酶活力、有机物的离子化程度、细胞膜的通透性等方面均有影响。由图 8 可以看出, 在发酵初始 pH 值选择 4.5–6.5 范围

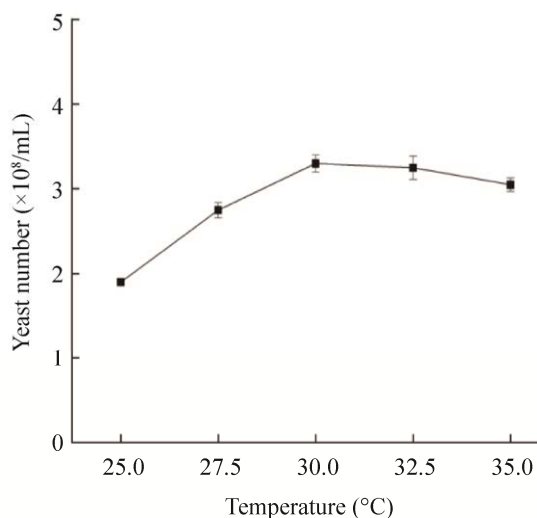


图 7 培养温度对菌株生长的影响

Figure 7 Effect of culture temperature on strain growth.

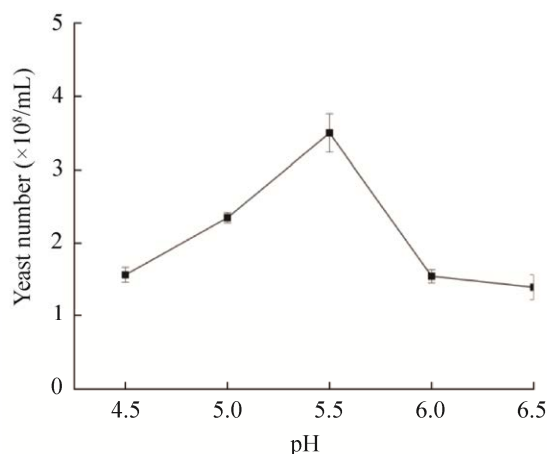


图 8 发酵初始 pH 对菌株生长的影响

Figure 8 Effect of initial pH on strain growth.

内, 菌株数量先增加后减少, 在 pH 5.5 时菌数达到最大值  $3.5 \times 10^8$  个/mL, 因此选择 pH 5.5 为酵母菌 Y1 的发酵初始最适 pH。

### 2.2.5 摇床转速对菌株生长的影响结果

不同摇床转速对菌株生长的影响见图 9。

摇床培养有利于好氧微生物生长, 在一定范围内, 转速提高有利于培养基溶氧量增加, 也有利于菌株充分利用培养基。由图 9 可以看出, 在 80–160 r/min 之间, 随摇床转速的增加, 菌株快速增长; 超过 160 r/min 后, 生长量的增

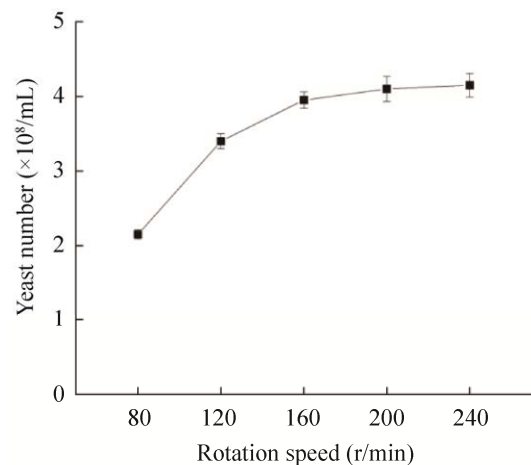


图 9 转速对菌株生长的影响

Figure 9 Effect of rotation speed on strain growth.

加变得缓慢。由于培养基中菌渣颗粒的存在, 转速过大时菌渣会出现挂壁现象, 影响菌株对菌渣的利用, 造成较大误差。综合考虑后, 选择摇床转速 160 r/min 作为菌株 Y1 培养的最适转速。

### 2.2.6 接菌量对菌株生长的影响结果

不同接菌量对菌株生长的影响见图 10。

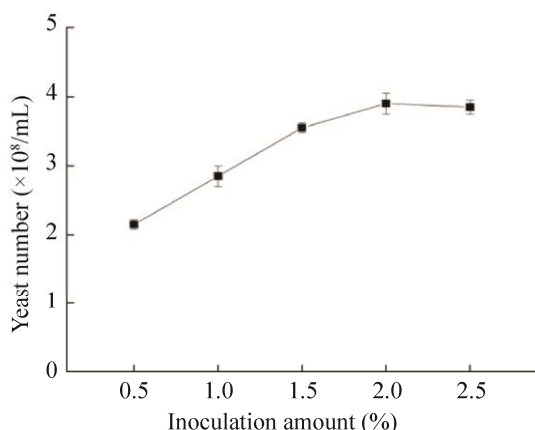


图 10 接菌量对菌株生长的影响

Figure 10 Effect of inoculation amount on strain growth.

适宜的接菌量有利于缩短菌株生长的延迟期, 迅速进入快速生长期。由图 10 可以看出, 随着接菌量的增加, 菌体数不断增加, 接菌量为 2.0% 时, 菌株数量最高达到  $3.90 \times 10^8$  个/mL; 接菌量 2.5% 时菌数有所下降。因此选择 2.0% 的接菌量为最佳接菌量。

### 2.3 Box-Behnken Design 试验结果

Box-Behnken Design 试验设计及结果见表 3 和表 4。

以菌株菌数为响应值, 利用 Design-Expert 10 软件对表 3 数据进行多元二次拟合分析, 建立菌数( $Y$ )和温度( $A$ )、pH ( $B$ )、转速( $C$ )的回归方程模型:

$$Y = 5.14 - 0.094A - 0.07B - 0.025C - 0.037AB - 0.00225AC + 0.0005BC - 0.54A^2 - 0.24B^2 - 0.15C^2$$

由表 4 可知, 回归模型  $P < 0.0001$ , 说明回归方程非常显著, 能较好地模拟出真实曲面; 通过  $F$  值的大小, 可知 3 个因素对酵母生长情况影响程度的大小依次为  $A > B > C$ 。相关系数

表 3 Box-Behnken design 试验设计及结果

Table 3 Design matrix and experimental results of Box-Behnken design

Assay	A: Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	B: pH	C: Rotation speed (r/min)	Y: Yeast number ( $\times 10^8/\text{mL}$ )
1	1 (35)	1 (5.5)	0 (160)	4.14
2	0 (30)	-1 (4.5)	-1 (120)	4.81
3	-1 (25)	0 (5.0)	1 (200)	4.50
4	0	-1	1	4.80
5	-1	-1	0	4.50
6	0	0	0	5.21
7	0	0	0	5.19
8	-1	1	0	4.40
9	1	-1	0	4.40
10	0	0	0	5.11
11	0	1	1	4.70
12	0	1	-1	4.71
13	1	0	-1	4.40
14	0	0	0	5.12
15	-1	0	-1	4.59
16	0	0	0	5.09
17	1	0	1	4.30



表 4 Box-Behnken Design 试验回归方程和方差分析

Table 4 Experimental regression equations and analysis of variance of Box-Behnken Design

Source	SS	DF	MS	F value	P value
Model	1.83	9.00	0.20	81.11	<0.000 1
A	0.07	1.00	0.07	28.01	0.001 1
B	0.04	1.00	0.04	15.88	0.005 3
C	0.01	1.00	0.01	2.02	0.198 5
AB	0.01	1.00	0.01	2.13	0.187 9
AC	0.00	1.00	0.00	0.01	0.930 9
BC	0.00	1.00	0.00	0.00	0.984 6
A <sup>2</sup>	1.25	1.00	1.25	497.37	<0.000 1
B <sup>2</sup>	0.24	1.00	0.24	95.72	<0.000 1
C <sup>2</sup>	0.10	1.00	0.10	38.51	0.000 4
Residual	0.02	7.00	0.00		
Lack of fit	0.01	3.00	0.00	0.90	0.514 6
Pure of fit	0.01	4.00	0.00		
Cor total	1.85	16.00			

$R^2=0.990\ 5$ 、调整后的  $R^2_{\text{Adj}}=0.978\ 3$  的差值<0.02, 二者差异<0.2 代表该模型拟合度良好, 误差小; 失拟项中  $F=0.90$ 、 $P=0.514\ 6$ , 二者均大于 0.01, 差异不显著, 说明模拟性较好; 在此模型中, A、B、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  等项对试验结果的影响极显著 ( $P<0.01$ ), 变异系数  $1.06\%<10\%$ , 精密密度为  $25.616>4$ , 表明该模型有较高的精密密度, 进一步证明该模型对酵母菌数的预测具有较高的可信度。

响应曲面及等高线图如图 11 所示。由图 11 可知, 响应面和等高线图表示两个因素之间的相互作用, 等高线呈椭圆形表明两个因素之间的交互作用对响应值影响显著。图 11A 和 11B 反映了 pH 和温度对酵母菌生长的影响, 其响应曲面图曲线较陡, 等高线呈椭圆形, 即 pH 和温度对酵母菌生长的交互效应显著。图 11C 和 11D 反映了温度和转速对酵母菌生长的影响, 其响应曲面图曲线较陡, 等高线呈椭圆形, 即温度和转速对酵母菌生长的交互效应显著。图 11E 和 11F 反映了 pH 和转速对酵母菌生长

的影响, 其响应曲面图曲线较陡, 等高线呈椭圆形, 即 pH 和转速对酵母菌生长的交互效应显著。

## 2.4 最佳培养条件的确定与验证

响应面法优化的菌株最佳培养条件为: 培养温度  $32.29\ ^\circ\text{C}$ 、初始 pH 4.91、摇床转速  $156.56\ \text{r/min}$ ; 预测最佳条件下菌株生长的菌数为  $5.00\times 10^8$  个/mL。根据实际情况, 调整最佳培养条件为: 培养温度  $32\ ^\circ\text{C}$ 、初始 pH 5.0、摇床转速  $160\ \text{r/min}$ 。按此条件重复 3 次实验, 得到菌株菌数约为  $5.11\times 10^8$  个/mL, 这与响应面预测的值相近, 说明此模型可靠合理。

## 2.5 菌株生长对土霉素菌渣成分的影响结果

酵母菌 Y1 在其最优培养条件下培养时, 发酵前后土霉素菌渣总量、含氮量与蛋白质质量的变化见表 5。

由表 5 可知, 相较于未发酵的菌渣, 发酵后的菌渣质量减少了 10.37%、减少的蛋白质质量占减少菌渣质量的 71.02%, 说明菌株主要利用菌渣中的蛋白质作为氮源进行自身生长。

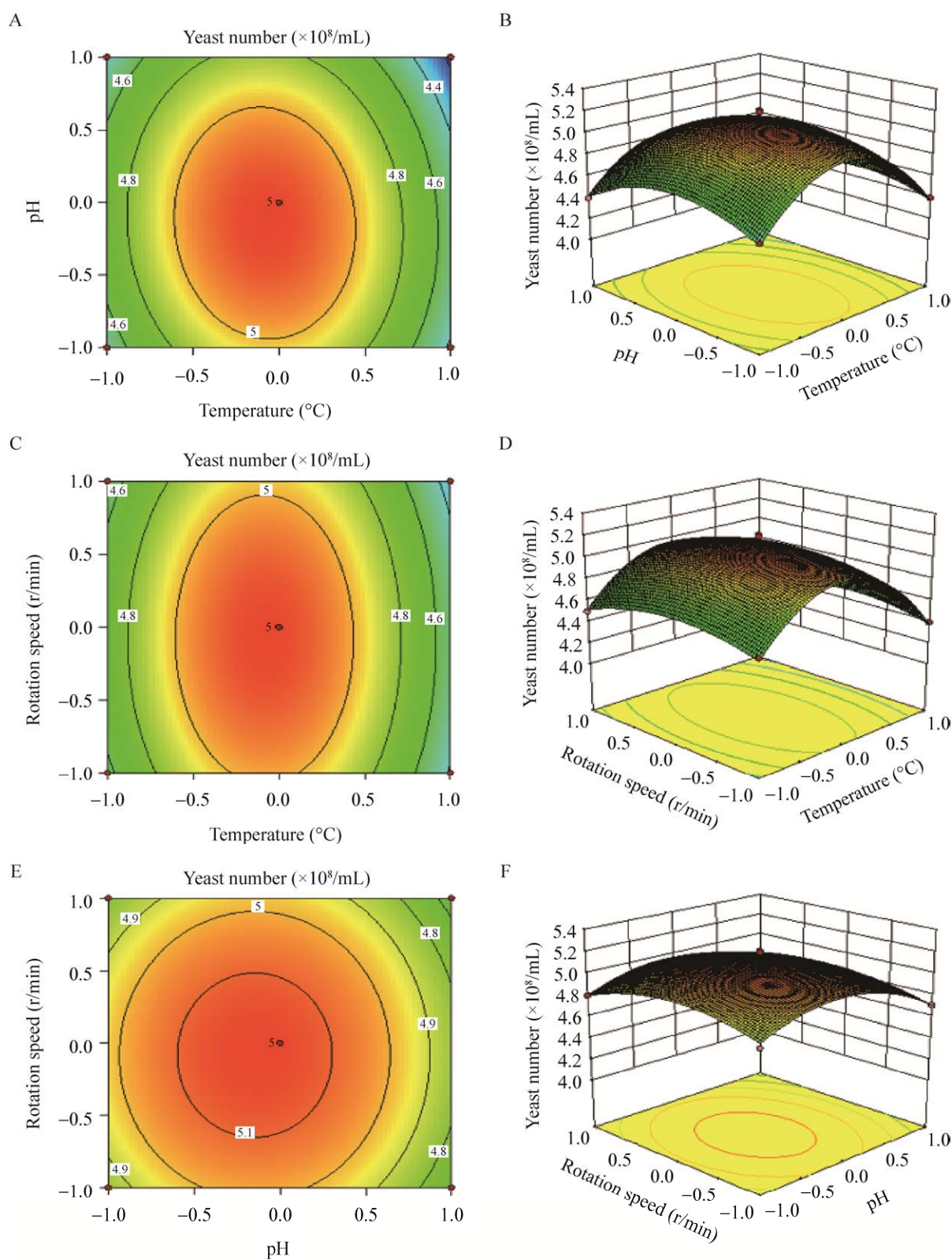


图 11 各因素交互作用对酵母菌数的响应面 and 对应等高线图

Figure 11 Response surface and corresponding contour map of interaction of factors to yeast number.

表 5 菌渣发酵前后成分变化

Table 5 Composition changes of oxytetracycline fermentation residue before and after fermentation

Factor	Before fermentation	Without fermentation	After fermentation
Weight (mg)	5 000	4 428	3 969
Nitrogen (mg)	375	318	266
Protein (mg)	2 344	1 990	1 664

### 3 讨论与结论

由于我国抗生素产量巨大,国家以及人们对环境问题越来越重视,这让抗生素菌渣的处理处置方式成为学者们研究的一大热点问题。土霉素菌渣中剩余的营养物质较多,是一种潜力较大的可利用资源。本文从土霉素菌渣中筛选的酵母菌属希腊接合囊酵母,暂命名为希腊接合囊酵母 Y1。其菌落边缘圆滑、呈白色、外表光滑;其菌体为卵圆状,大小约为  $4.0\ \mu\text{m}\times 2.0\ \mu\text{m}$ 。经单因素试验与 Box-Behnken design 试验得到 Y1 的最佳培养条件为:在以 5%土霉素菌渣为主要营养成分的培养基中,添加 0.5%的葡萄糖,接菌量为 2%,在 pH 5.0、32 °C、160 r/min 条件下培养 24 h,酵母菌数可达到  $5.11\times 10^8$  个/mL,证明了利用土霉素菌渣培养菌株 Y1 是可行的。Y1 在菌渣中生长后,减少的蛋白质质量占减少菌渣质量的 71.02%,说明菌株主要利用菌渣中的蛋白质作为氮源进行自身的生长。本研究为后续利用土霉素菌渣生产酵母膏代替品提供了理论基础。这样不仅可以降低一般酵母膏的生产成本,在生物领域有广泛的应用前景,还可实现土霉素菌渣的废物利用并减少环境污染等问题。

### REFERENCES

- [1] 何鲁波, 李新新, 黄周珍. 抗生素制药菌渣处理技术[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2019(6): 53-54  
He LB, Li XX, Huang ZZ. Treatment technology of

- pharmaceutical antibiotic fermentation residue[J]. Graziery Veterinary Sciences: Electronic Version, 2019(6): 53-54 (in Chinese)
- [2] 邹书娟, 王一迪, 张均雅, 杨萍, 王伟. 抗生素菌渣理化性质分析[J]. 环境科学与技术, 2018, 41(S1): 47-52  
Zou SJ, Wang YD, Zhang JY, Yang P, Wang W. Analysis of physical and chemical properties of antibiotic bacterial residue[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 41(S1): 47-52 (in Chinese)
- [3] 邢奕. 抗生素菌渣(危废)减量化现状、存在问题及对策[J]. 中华环境, 2021(10): 31-33  
Xing Y. Present situation, existing problems and countermeasures of antibiotic fermentation residue (hazardous waste)[J]. China Environment, 2021(10): 31-33 (in Chinese)
- [4] 王小春. 生物法青霉素菌渣无害化处理工艺研究[D]. 石家庄: 河北科技大学硕士学位论文, 2018  
Wang XC. Study on the harmless treatment process of penicillin mycelium by biological method[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei University of Science and Technology, 2018 (in Chinese)
- [5] Kakimoto T, Osawa T, Funamizu N. Antibiotic effect of amoxicillin on the feces composting process and reactivation of bacteria by intermittent feeding of feces[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(18): 3555-3560
- [6] 石鹏, 艾晗, 王辉, 孙德智. 抗生素制药菌渣的处理处置技术进展与分析[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(7): 486-494  
Shi P, Ai H, Wang H, Sun DZ. Progress and analysis of antibiotics bacterial residue disposal[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2015, 40(7): 486-494 (in Chinese)
- [7] 刘伟, 闫正, 孙宏丽, 任士明, 殷宇朝. 土霉素药渣作为有机肥添加剂的研究[J]. 农业与技术, 2016, 36(19): 51-54  
Liu W, Yan Z, Sun HL, Ren SM, Yin YZ. Study on oxytetracycline fermentation residue as organic fertilizer additive[J]. Agriculture and Technology, 2016, 36(19): 51-54 (in Chinese)
- [8] 惠兴育. 利用四环素菌渣好氧生产酵母浸膏的应用研究[D]. 银川: 宁夏大学硕士学位论文, 2012.  
Hui XY. Study on the application of aerobic production of yeast extract from tetracycline waste[D]. Yinchuan: Master's Thesis of Ningxia University, 2012 (in Chinese)
- [9] 王冰. 青霉素菌渣制取饲料酵母与酵母膏的工艺研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学硕士学位论文, 2013  
Wang B. Research on production of feed yeast and yeast

- extract with penicillin mycelium[D]. Harbin: Master's Thesis of Harbin Institute of Technology, 2013 (in Chinese)
- [10] 陈立文, 方森海, 王明兹. 抗生素发酵废菌渣的无害化及资源再利用研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(5): 13-19
- Chen LW, Fang SH, Wang MZ. Research progress on the harmless treatment and resource reuse of antibiotic bacteria residues[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(5): 13-19 (in Chinese)
- [11] 令利军, 杨彩云, 李子彬, 罗鸿, 冯升来, 赵云花, 涂艺馨. 嗜酸寡养单胞菌 EFS<sub>1</sub> 的产电性能及在污水处理中的应用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(5): 1504-1513
- Ling LJ, Yang CY, Li ZB, Luo H, Feng SL, Zhao YH, Tu YX. Electrical performance and application in sewage treatment of an electricigenic strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* EFS<sub>1</sub>[J]. Microbiology China, 2021, 48(5): 1504-1513 (in Chinese)
- [12] 李新, 于慧瑛, 杜磊, 曹建斌. 一株盐湖芽孢杆菌 LG 的鉴定及其抗金黄色葡萄球菌活性研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1294-1300
- Li X, Yu HY, Du L, Cao JB. Characterization of *Bacillus* sp. LG from Yuncheng salt lake and its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*[J]. Microbiology China, 2015, 42(7): 1294-1300 (in Chinese)
- [13] 胡春辉, 徐青, 孙璇, 于浩, 袁玉清. 几种典型扫描电镜生物样本制备[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(20): 5389-5392, 5402
- Hu CH, Xu Q, Sun X, Yu H, Yuan YQ. Several biological typical samples preparation methods of scanning electron microscope[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(20): 5389-5392, 5402 (in Chinese)
- [14] 金红, 张小燕, 路宏科, 殷欣, 张辉, 彭涛. 耐高渗酵母选育及其在葡萄酒中的应用研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(6): 192-195
- Jin H, Zhang XY, Lu HK, Yin X, Zhang H, Peng T. Breeding of hyperosmotic yeasts and their application in wine[J]. China Brewing, 2021, 40(6): 192-195 (in Chinese)
- [15] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005
- Du LX, Lu FP. Microbiological Experimental Technology[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2005. (in Chinese)
- [16] 穆英健, 侯红霞, 聂斌. 酵母死亡率检测方法的差异性分析[J]. 中外酒业·啤酒科技, 2019(21): 13-18
- Mu YJ, Hou HX, Nie B. Difference analysis of yeast mortality detection methods[J]. Global Alcinfo, 2019(21): 13-18 (in Chinese)
- [17] 张昊月, 郭正彦, 吕志堂, 陈义华. 应用响应面法优化发酵培养基提高达托霉素产量[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 113-122
- Zhang HY, Guo ZY, Lyu ZT, Chen YH. Medium optimization with the response surface methodology to improve daptomycin production[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 113-122 (in Chinese)
- [18] Ju Y, Son KH, Jin CZ, Hwang BS, Park DJ, Kim CJ. Statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces rimosus* AG-P1441[J]. Food Science and Biotechnology, 2017, 27(2): 581-590
- [19] 马红丽, 付晓平, 郑雯, 徐健勇, 郑宏臣, 宋诤. 费希尔曲霉脂肪酶在毕赤酵母中的优化表达及高密度发酵[J]. 微生物学通报, 2020, 47(7): 2140-2150
- Ma HL, Fu XP, Zheng W, Xu JY, Zheng HC, Song H. Optimized expression and high-density fermentation of *Aspergillus fischeri* lipase in *Pichia pastoris*[J]. Microbiology China, 2020, 47(7): 2140-2150 (in Chinese)
- [20] Rohmatussolihat, Lisdiyanti P, Sari MN, Sukara E. Response surface methodology for optimization of medium components for extracellular protease production by *Enterococcus faecalis* InaCC B745[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 762(1): 012078